



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 196 16 750 A 1

⑯ Int. Cl. 6:  
C 12 Q 1/68

DE 196 16 750 A 1

⑯ Aktenzeichen: 196 16 750.7  
⑯ Anmeldetag: 26. 4. 96  
⑯ Offenlegungstag: 6. 11. 97

⑯ Anmelder:  
NewLab Diagnostic Systems GmbH, 40699 Erkrath,  
DE  
  
⑯ Vertreter:  
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln

⑯ Erfinder:  
Leiser, Robert-Matthias, Dr., 42697 Solingen, DE;  
Sperveslage, Jens, 40699 Erkrath, DE

⑯ Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in Gemischen

⑯ Beschrieben wird ein Verfahren, das den Nachweis und die Identifikation von Mikroorganismen ermöglicht, die sich in einer Mischprobe befinden, ohne daß für die Identifikation eine Trennung der Keime z. B. durch Einzelkolonie-Passagen notwendig ist. In diesem Verfahren werden molekularbiologische Techniken angewendet. Durch Hybridisierung mit Sonden, die unterschiedlich konservierte Abschnitte der Erbinformation der betreffenden Mikroorganismen erkennen können, wird die Detektion und Differenzierung der Mikroorganismen im Gemisch erreicht. Hierbei wird eine Kombination aus allgemeiner Keimbestimmung auf Basis hochkonservierter Sequenzabschnitte und individuell definierter Spezifizierung durch weniger konservierte Sequenzabschnitte vorgenommen. Vorzugsweise wird für hinreichende Sensitivität des Nachweises eine Amplifikation des Nucleinsäureabschnitts, z. B. mittels PCR, durchgeführt.

DE 196 16 750 A 1

## Beschreibung

5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von interessierenden Mikroorganismen in einer den oder die interessierenden Mikroorganismus(men) enthaltenen Probe, in der ein Gemisch von Mikroorganismen vorliegen kann, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen.

10 Die Identifikation von Mikroorganismen aus komplexen Proben (die mehrere unterschiedliche Keime im Gemisch enthalten) ist eine wichtige und schwierige Aufgabe z. B. bei Hygieneuntersuchungen und anderen Vorhaben.

15 Stand der Technik ist hier die Kultivierung der Mikroorganismen, ihre Selektivanreicherung auf speziellen Nährmedien, die Einzelkoloniepassage und schließlich die taxonomische Identifikation unter Analyse verschiedener phänotypischer Parameter (Gram-Färbung, Begeißelung, stoffwechsel-physiologische Leistungen etc.). Besondere Anerkennung und Bedeutung hat die Fettsäureanalyse gewonnen. Die typischen Profile der gaschromatographischen Trennung der Fettsäuren der Mikroorganismen gestatten in der Regel eine Art- oder sogar Pathovarietäten- und Serotypen-Identifikation. Der hierfür nötige apparative Aufwand ist allerdings sehr hoch und nur für große Laboratorien realisierbar. Außerdem verlangt die notwendige Reinanzucht der Einzelkolonien einen erheblichen Zeit- und Materialaufwand.

20 Daneben gibt es Systeme, die eine ähnlich genaue Differenzierung und Identifikation von Mikroorganismen auf der Basis von Stoffwechselleistungen der Zellen versprechen. Abgesehen von häufigen Fehlinterpretationen ist dieses Verfahren wiederum mit dem schwerwiegenden Nachteil belastet, daß es nur an Reinkulturen zu verwertbaren Aussagen führt. Dies ist jedoch, wie erwähnt, eine aufwendige, langwierige und kostenintensive Aufgabe.

25 Ein weiterer Nachteil bekannter Identifikationssysteme besteht darin, daß bei der Untersuchung komplexer Proben eine Vielzahl von Mikroorganismen unerkannt bleibt, weil ihre Kultursprünge unbekannt sind.

30 25 Die Aufklärung von konservierten Sequenzabschnitten im Bereich der ribosomalen Gene bei Prokaryonten und ihre Nutzung für molekularbiologische Nachweistechniken (Hybridisierung bzw. Amplifikationsmethoden wie PCR) hat in den letzten fünf Jahren phylogenetische Zusammenhänge aufdecken können, die die Bakterientaxonomie entscheidend vorangebracht haben. Der Wert dieser Methode für diagnostische Aufgabenstellungen in der Bakteriologie ist heute bereits unbestritten.

35 30 Genutzt wird diese Technik gegenwärtig einerseits für taxonomische Fragestellungen. Hierbei werden vorrangig nach Amplifikation unter Nutzung hochkonservierter Primersequenzen die entstandenen Amplicons kloniert, sequenziert und ihre Homologie zu bekannten Sequenzen für die taxonomische Identifikation bzw. Einordnung eingeschätzt.

40 35 Andererseits werden auf der Basis derart gewonnener Sequenzinformationen Primer für diagnostische Aufgabenstellungen entworfen, um interessierende Organismen direkt nachweisen zu können. Es existieren mittlerweile vielfältige Protokolle für den Nachweis der unterschiedlichsten Mikroorganismen-Arten und Subtypen.

45 40 Der Nachteil dieses Standes der Technik besteht darin, daß entweder für jede diagnostische Aufgabenstellung eine individuelle Analyse oder aber bei der Charakterisierung von komplexen Gemischen aufwendige Genklonierungen durchgeführt werden müssen.

50 45 Unter Nutzung hochkonservierter Primersequenzen werden in komplexen Proben durch alternative Verfahren Teile der Erbinformation der vorhandenen Mikroorganismen amplifiziert und die Einschätzung der Probenkomplexität sowie die taxonomische Identifikation ihrer Bestandteile durch anschließende Analyse von Restriktionslängen-Polymorphismen vorgenommen. Dieser Auswertemodus ist als sehr aufwendig und wenig routinengeeignet einzuschätzen.

55 50 Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das eine sichere Bestimmung etwaiger in einer Probe befindlicher Mikroorganismen zuläßt, selbst wenn diese in einer Mischung mit Mikroorganismen verschiedenster Art vorliegen. Dabei soll das Verfahren neben hoher Sicherheit in der Bestimmung der Mikroorganismen auch einfach und kostengünstig durchzuführen sein.

60 55 Dieses Problem wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Das erfindungsgemäße Verfahren ist zum Nachweis von interessierenden Mikroorganismen in einer den oder die interessierenden Mikroorganismus(men) enthaltenen Probe, in der ein Gemisch von Mikroorganismen vorliegen kann geeignet. Dabei werden molekularbiologische Techniken, wie Amplifikationsreaktionen eingesetzt. Erfindungsgemäß werden mindestens eine Hybridisierungssonde (A) die konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist und mindestens eine Hybridisierungssonde (B), die weniger konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist, zu der Probe gegeben mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungssonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß und die Probe sich in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet. Durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster erfolgt eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen.

65 60 Durch die Verwendung von Hybridisierungssonden, die mikrobiellen Nucleinsäuresequenzen unterschiedlichen Konservierungsgrades entsprechen, wird der Nachweis und die Identifikation von Mikroorganismen ermöglicht, die sich in einer Mischprobe befinden, ohne daß für die Identifikation eine Trennung z. B. durch Einzelkolonie-Passagen notwendig ist. Hierbei wird eine Kombination aus allgemeiner Keimbestimmung auf Basis hochkonservierter Sequenzabschnitte und individuell definierbarer Spezifizierung durch weniger konservierte Sequenzabschnitte vorgenommen.

70 65 Vorzugsweise werden zur Gewährleistung einer ausreichenden Sensitivität des Tests unter Nutzung der Hybridisierungssonden als Startermoleküle Teile der Erbinformation in vitro amplifiziert (z. B. durch PCR). Erfindungsgemäß werden vorzugsweise die Hybridisierungssonde(n) A als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B zur Detektion genutzt. Es ist aber ebenfalls möglich, die Hybridisierungssonde(n)

B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) A zur Detektion, die Hybridisierungssonde(n) A und B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B zur Detektion oder die Hybridisierungssonde(n) A und B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) A zur Detektion zu nutzen.

Diese Starter-Hybridisierungssonden (Primer) entsprechen entweder denjenigen hohen Konservierungsgrades oder aber denjenigen hoher Spezifität, während für die Detektion Hybridisierungssonden des jeweilig entgegengesetzten Konservierungsgrades verwendet werden. 5

Der Vorteil dieser Ausführungsform besteht darin, daß auf diese Weise die gewünschte Verknüpfung von Amplifikation und Detektion mit den Hybridisierungssonden engerer und breiterer Spezifität realisiert wird. 10

Vorteilhafterweise erfolgt ein Teil des Verfahrens an einer festen Phase durch Bindung eines Teils der Hybridisierungssonden, wobei die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase nach der Amplifikation erfolgt oder daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase vor der Amplifikation erfolgt und die Amplifikation zumindest teilweise an der festen Phase verläuft. Dies hat den Vorteil, daß auf einfache Weise die gebildeten Komplexe aus Amplifikat und Detektionssonde von sonstigen Komponenten vorangegangener Reaktionsstufen getrennt werden können. 15

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens befindet oder befinden sich die weniger konservierte(n) Sequenz(en), die der (den) Hybridisierungssonde (n) B entspricht (entsprechen), zwischen den konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde (n) A entspricht (entsprechen) oder die konservierte (n) Sequenz(en), die der (den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), befindet oder befinden sich zwischen den weniger konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen). Vorteilhaft ist dies, weil eine zusätzliche Selektion der sequenzrichtigen Amplifikation erreicht wird. 20

Insbesondere kann erfindungsgemäß die Amplifikation simultan mit mehreren Starterpaaren auf gleichzeitig mehreren Targetsequenzen durchgeführt werden. Dieses bietet den Vorteil, in einer Reaktion auch solche Mikroorganismen gleichzeitig zu amplifizieren, für die keine hinreichend übereinstimmenden Hybridisierungssonden als Starter existieren. 25

Es ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich, die Detektion simultan mit mehreren verschiedenen Sonden durchzuführen, um vorteilhafterweise, entsprechend der analytischen Aufgabenstellung, Gruppen von Mikroorganismen detektieren zu können, ohne daß entsprechende Hybridisierungssonden dieser Gruppenspezifität zur Verfügung stehen müssen. 30

Ribosomale Gensequenzen haben sich als besonders geeignet erwiesen, im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt zu werden. Ribosomale Gensequenzen bieten den Vorteil, daß sie hochkonservierte und weniger konservierte Abschnitte in der hier interessierenden bevorzugten engen Nachbarschaft aufweisen. Ein weiterer Vorteil der Verwendung dieser Gensequenzen besteht darin, daß ribosomale Gene in mehreren Kopien je Genom von Mikroorganismen existieren, was zu einer vergleichsweise höheren Sensitivität des erfindungsgemäßen Assays beiträgt. 35

Durch Temperatur, Ionenstärke und andere insbesondere die Wasserstoffbrückenbildung beeinflussende Faktoren können die Hybridisierungsbedingungen jeweils so stringent gewählt werden, daß die für die Aussage des Verfahrens erforderliche Spezifität der Hybridisierungsreaktion(en) zwischen Targetsequenz und den Hybridisierungssonden gewährleistet wird. 40

Wie die Stringenz im einzelnen zu wählen und einzustellen ist, kann der Fachmann mit ihm bekannten Mitteln festgestellt werden (vergl. U. Wobus, "Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren", Akademie-Verlag, Berlin, 1981, 229 Seiten).

Die Auswahl der Hybridisierungssonden erfolgt in Abhängigkeit von der analytischen Aufgabenstellung. Es sind sowohl allgemeine Keimzahlbestimmungen in Kombination mit der Detektion spezieller Arten als auch die Analyse und Charakterisierung sehr komplex zusammengesetzter Proben möglich. 45

Die Erfindung wird an dem folgenden Beispiel näher erläutert. Es sollten aus einer Gemischprobe mit insgesamt 4 verschiedenen Mikroorganismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* nachgewiesen werden.

### Beispiel

50

Das Vorgehen gliederte sich in folgende Etappen:

1. Auswahl der Sequenzen für die Sonden
2. Probenvorbereitung
3. PCR-Amplifikation
4. Detektion

55

#### 1. Auswahl der Sequenzen für die Sonden

60

##### Hybridisierungssonden A

Die Hybridisierungssonden A mit Breitband-Spezifität dienten zur Amplifikation aller in der Untersuchungsprobe vorhandenen Bakterien und entsprachen einem hochkonservierten Abschnitt der ribosomalen 16S rDNA nach Stackebrandt und Liesack (Handbook of New Bacterial Systematics, p 151 – 193, 1993): 65

## 16S-rDNA Primer zur Amplifikation

10-30f: GAG TTT GAT CCT GGC TCA G  
 5 530r: GTA TTA CCG CGG CTG CTG

## Hybridisierungssonden B

10 Die Hybridisierungssonden B mit engerer Spezifität dienten als Detektionssonden.  
 Zur Auswahl der geeigneten Detektionssonden wurden Datenbankrecherchen durchgeführt. Auf diese Weise konnte unter anderem gezeigt werden, daß die ausgewählten Sonden spezifisch für den jeweiligen Organismus sind. Dabei ergaben sich folgende Sequenzen:

15 *Escherichia coli*: AAC GUC GCA AGA CCA AAG  
*Bacillus subtilis*: GGT TGT TTG AAC CGC ATG GTT

20 Die Sonden wurden zur Detektion mittels ELISA-Reader am 5'-Ende biotinyliert. Dadurch konnte nach Zugabe einer Streptavidin-konjugierten Peroxidase ein Farbumschlag detektiert werden (Soumet et al., Bio-Techniques 19 : 792-796 (1995)).  
 Beide Sonden wurden in 5 getrennten Versuchen auf ihre Spezifität hin überprüft, indem jeder Organismus mit den eigenen sowie den für den anderen Organismus spezifischen Sonden kontrolliert wurde.  
 25 Außerdem wurden die Sonden an vier weiteren Mikroorganismen getestet. Dabei ergaben sich keine Kreuzreaktionen.

## 2. Probenvorbereitung

30 Zunächst wurden in gepuffertem Peptonwasser die Keime angezüchtet und anschließend aus dieser Gemischprobe die DNA aller Organismen mittels eines DNA-Isolierungskits isoliert.

## 3. PCR-Amplifikation

35 Für die PCR-Amplifikation wurde ein Primer (530r, s. o.) nach Anweisung der Firma Nunc kovalent an die Kavität der CovaLink™-Platte gebunden.  
 Dazu wurde in jede Kavität ein Gemisch aus 100 ng des zuvor am 5'-Ende phosphorylierten 530r-Primers, gelöst in 75 µl 13 mM 1-methyl-imidazol, gegeben. Hinzugefügt wurden 25 µl frisch angesetzte 40 mM 1-Ethyl-40 3-(3-Di-methylaminopropylcarbodiimide (EDC)). Die Platte wurde dann bei 50°C für 5 Stunden inkubiert und dreimal bei 50°C mit 0,4 N NaOH, 0,25% Tween 20 gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit der Waschlösung, woran sich weitere drei Waschungen anschlossen. Als letzte Waschlösung wurde deionisiertes Wasser eingesetzt.  
 Zur Amplifizierung der 16S-rDNA wurde die Methode nach Stackebrandt und Liesack (Handbook of New 45 Bacterial Systematics, p 151–193, 1993) leicht modifiziert. Folgende PCR-Bedingungen wurden in der PCR eingesetzt:

	Reaktionskomponen- ten:	Reaktionsansatz:	Cyclerbedingungen:
50	10x Reaktionspuffer: 2M Tris 100 mM MgCl <sub>2</sub> 1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% Tween dNTP-Mix: jeweils 1M Steriles Wasser	5 µl Reaktionspuffer 10 µl dNTP 0,5 µM Primer 10-30f 0,06 µM Primer 530r 5 µl DNA 2,5 U Taq add 50 µl steriles Wasser	94°C 3 min 1 Zyklus 93°C 1 min 55°C 1 min 74°C 1 min 28 Zyklen 74°C 10 min 4°C hold 1 Zyklus

## 4. Detektion

Nach Beendigung der PCR wurde nach dem Protokoll der Firma Nunc weiterverfahren und die Hybridisierung der Detektionssonden durchgeführt. 5

Nach der Amplifikation wurden die Kavitäten trockengesaugt und zweifach mit 0,2 M NaOH, jeweils mit 5-minütiger Inkubation, gewaschen. Anschließend wurde zweifach mit Hybridisierungslösung ( $\&x$  standard saline citrate [SSC], 5  $\times$  Denhardt's Lösung, 100 µg/ml gescherter und denaturierter Heringssperma-DNA) gewaschen. Für die Hybridisierung wurden die biotinylierten Hybridisierungssonden auf eine Konzentration von 0,1 nmol/L in Hybridisierungslösung eingestellt und in 100 µl-Aliquots in die Kavitäten gefüllt. Die Hybridisierungsreaktion lief bei 37°C für 3 h. Danach wurden drei Waschschritte bei 37°C durchgeführt. Das erste Mal mit 2  $\times$  SSC, 0,1% Tween 20 für 20 Minuten. Die beiden anderen Male mit 0,1  $\times$  SSC, 0,1% Tween 20 für jeweils 20 Minuten. 10

Anschließend wurde die Strepavidin konjugierte Peroxidase dazugegeben. Die Peroxidase (Sigma Chemica, St. Louis, MO, USA) wurde in SPO-Lösung (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,05% Tween 20) 1:1000 verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit SPO-Lösung gewaschen. 15

Als Substrat wurden 100 µl TMB-Lösung (1,5 mg/ml Tetramethylbenzidine, Sigma Chemica) in 25 mM Citronensäure, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10% Dimethyl Sulfoxid [DMSO], pH 5,0) gelöst und dazugegeben. Nach 45 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion mit 25 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und bei 450 nm am ELISA-Reader gemessen. 20

Die zu beobachtenden Farbveränderungen in den einzelnen Kavitäten waren der Indikator für das Vorhandensein derjenigen Bakterienart in der Untersuchungsprobe, der die zugesetzte Detektionssonde entsprach. 25

Es konnte so gezeigt werden, daß sich aus einem Gemisch von verschiedenen Mikroorganismen ohne Herstellung einer Reinkultur individuelle Arten eindeutig nachweisen lassen. 25

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von interessierenden Mikroorganismen in einer den oder die interessierenden Mikroorganismus(men) enthaltenen Probe, in der ein Gemisch von Mikroorganismen vorliegen kann, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen, wobei mindestens eine Hybridisierungssonde (A) die konservierten Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist und mindestens eine Hybridisierungssonde (B), die weniger konservierten Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist, zu der Probe gegeben werden mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungssonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß, sich die Probe in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet und durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen erfolgt. 30
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für ausreichende Sensitivität Teile der Erbinformationen *in vitro* amplifiziert werden. 40
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonde(n) A und/oder B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B oder A zur Detektion genutzt werden. 45
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich die weniger konservierte(n) Sequenz(en), die der(den) Hybridisierungssonde (n) B entspricht (entsprechen), zwischen den konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), befindet. 50
5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich die konservierte(n) Sequenz(en), die der(den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), zwischen den weniger konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen), befindet. 55
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Hybridisierungssonden an einer festen Phase gekoppelt ist. 60
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase nach der Amplifikation erfolgt. 65
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase vor der Amplifikation erfolgt und die Amplifikation zumindest teilweise an der festen Phase verläuft. 70
9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation simultan mit mehreren Starterpaaren auf gleichzeitig mehreren Targetsequenzen durchgeführt wird. 75
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion simultan mit mehreren verschiedenen Sonden erfolgt. 80
11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonden Teile von ribosomalen Gensequenzen sind. 85
12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsbedingungen durch Temperatur, Ionenstärke und andere die Wasserstoffbrückenbildung beeinflussende Faktoren jeweils so

stringent gewählt werden, daß die für die Aussage des Verfahrens erforderliche Spezifität der Hybridisierungsreaktion(en) zwischen Targetsequenz und den Hybridisierungssonden gewährleistet wird.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65